

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-322791

(43)Date of publication of application : 24.11.1999

(51)Int.Cl.

C07K 14/08
A01N 63/00
A61K 39/00
C12N 1/21
C12N 15/09
C12P 21/02
C12Q 1/70
G01N 33/53
G01N 33/569
// (C12N 1/21
C12R 1:19)
(C12N 15/09
C12R 1:92)
(C12P 21/02
C12R 1:19)

(21)Application number : 10-127235

(71)Applicant : FISHERIES AGENCY

(22)Date of filing : 11.05.1998

(72)Inventor : YOSHIMIZU MAMORU
MUROGA KIYOKUNI
WATANABE KENICHI

(54) RECOMBINANT TEGMEN PROTEIN OF FISH NODAVIRUS

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new recombinant protein useful as an immunological antigen for safely protecting fish diseases caused by viral neural necrosis virus by using a fish nodavirus as a starting material.

SOLUTION: This new recombinant tegmen protein is originated from a fish nodavirus such as the viral neural necrosis virus(SJNNV) of *Caranx delicatissimus*, the viral neural necrosis virus(BFNNV) of *Verasper moseri* or the viral neural necrosis virus(JFNNV) of *Paralichthys olivaceus*. The new recombinant tegmen protein originated from the fish nodavirus is produced using recombinant *Escherichia coli* EX-SJ-213 (FERM P-16755) or recombinant *Escherichia coli* EX-B-203 (FERM P-16754), and is preferably used as an immunological antigen for fishes against fish nodaviral diseases.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 03.07.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 30.11.2004

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-322791

(43) 公開日 平成11年(1999)11月24日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
C 0 7 K 14/08		C 0 7 K 14/08	
A 0 1 N 63/00		A 0 1 N 63/00	A
A 6 1 K 39/00	A F E	A 6 1 K 39/00	A F E H
C 1 2 N 1/21		C 1 2 N 1/21	
15/09		C 1 2 P 21/02	C
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 15 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平10-127235

(22) 出願日 平成10年(1998) 5月11日

(71) 出願人 591257937

水産庁長官

東京都千代田区霞ヶ関 1-2-1

(72) 発明者 吉水 守

北海道函館市宮岡町 2-30-7

(72) 発明者 室賀 清邦

広島県東広島市西条町大字土与丸169-171

(72) 発明者 渡辺 研一

北海道厚岸郡厚岸町白浜町30-14

(74) 代理人 弁理士 八田 幹雄 (外 3 名)

(54) 【発明の名称】 魚類ノダウイルスの組換え外被タンパク質

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 ウイルス性神経壊死症ウイルスによる魚類の疾病を防御するための免疫用抗原や疾病を検査するための抗体検出用 E L I S A の抗原、血清学的診断に使用される抗体を作成するための抗原として用いられる新規な魚類ノダウイルスの組換え外被タンパク質を提供する。

【解決手段】 魚類ノダウイルス由来の組換え外被タンパク質。

【0025】この純化ウイルスからプロテイナーゼKを用いた抽出法("Journal of General Virology" (1995), 76, 1563-1569 参照)により核酸を抽出し、0.1倍容の3 M酢酸アンモニウムと2.5倍容の100%エタノールを加えエタノール沈殿を行なった。得られた核酸沈殿物を適量のDDWに溶解することにより、SJNNVの核酸試料を調製した。同様の方法を用いて、シマジ感染病魚および健康魚からも、核酸試料を調製した。

【0026】(純化ウイルスの病原性試験) 純化ウイルスを最終濃度が 1×10^{-1} 、 1×10^{-2} 、 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 及び 1×10^{-5} ng/mlとなるように、500 mlの海水に添加し、孵化後1日齢のシマジ仔魚500尾を収容した。陰性対照として、ウイルス無添加区を設けた。飼育水温25°C、無給餌、および止水といった条件下で6日間観察し、その間、毎日10尾ずつ無作為にサンプリングした。感染死亡した仔魚は、ごく短期間のうちに崩壊、消失してしまうため、死亡率を求めることは困難であり、感染の成立は採取した10尾の魚におけるウイルス抗原量をELISAにより確認すると共に、瀕死魚の一部を用い、組織学的症状の確認を行った。この際、ELISA法は、以下のようにして、行った。まず、10尾の仔魚を磨砕後、炭酸緩衝液(pH 9.8)で1,000倍に希釈し、希釈液をマイクロプレート(三光純薬)に1ウェル当たり100 µlを接種し、37°Cで4時間、吸着させた。ブロックエース(大日本製薬)でブロッキングし、これにPBST(0.05%ツーン20を含むPBS)で1,000倍希釈した抗SJNNVウサギ抗血清を37°Cで2時間、PBSTで3,000倍に希釈したアルカリホスファターゼ標識抗ウサギIgGブタ抗体(DAKO)を37°Cで2時間、順次反応させた。発色基質として1 mg/mlのp-ニトロフェニルリン酸を含むジエタノールアミン液を加え、添加してから1時間後に405 nmにおける吸光度を測定した。

【0027】2) PCRによる核酸の増幅

上記1)で得られたSJNNVの核酸試料を90°Cで5分間加熱後水中で急冷し、20 µlの反応液(10 mM トリス-塩酸(pH 8.3)、50 mM MgCl₂、各デオキシヌクレオチド三リン酸(dNTP; Pharmacia)、0.5 µM 下流プライマー、125 kU M-MLV逆転写酵素(USB)、5 kU RNaseインヒビター(TOYOBO))中で42°C、30分間逆転転写反応を行なった後、99°Cで10分間加熱した。この反応液に対し5倍容のPCR溶液(10 mM トリス-塩酸(pH 8.3)、50 mM KCl、2 mM MgCl₂、0.1 µM 上流プライマー、2.5 U Taq DNAポリメラーゼ(Perkin-Elmer))を加え、自動温度シークエンス装置(Astec PC-700)を用いて72°Cで1

0分間、さらに95°Cで2分間、反応後、95°Cで40秒間、55°Cで40秒間、および72°Cで40秒間の一連の反応を25サイクル行なった後、72°Cで5分間反応させることにより、SJNNVの外被タンパク質遺伝子(RNA2;"Journal of General Virology" (1995), 76, 1563-1569 ; 及び"Diseases of Aquatic Organisms" (1994), Vol.18: 103-107 参照)からオープンリーディングフレーム(ORF)を含む領域を増幅した。この際、上流(センス)プライマーとしては、RNA2の塩基番号17~33に一致する17塩基とNcoI認識配列を付加するために設けた5'-末端側の5'-GACTCC-3'配列を合わせた23塩基(5'-gactccATGGTACGCAAAGGTGA-3')からなるNNV F-5を、および下流(アンチセンス)プライマーとしては、RNA2の塩基番号1371~1387に相補的な17塩基とXhoI認識配列を付加するために設けた5'-末端側の5'-CAGCTCGA-3'配列を合わせた25塩基(5'-cagctcgaggccATTTAACCACATG-3')からなるNNV R-3を、それぞれ使用する。

【0028】3) PCR産物の解析

上記2)でPCRを行った後、増幅産物(10 µl)を、TAE緩衝液(40 mM トリス-酢酸(pH 7.2)、1 mM EDTA)で調製した3.0%アガロースゲル(NuSieve 3:1 Agarose; FMC)で電気泳動し、エチジウムブロミドで染色を行い、増幅産物の有無および分子量を確認し、予想された大きさのDNAの増幅を確認すると共に、増幅産物とSJNNVのRNA2との相補性を確認するため、ジギシゲニン(DIG)標識プローブ(pBSJ-69クローン由来)を用いてサザンブロットを行ない、増幅産物がRNA2のcDNAと相補性を有することを合わせて確認する。これにより、増幅産物が確かに目的とするRNA2のORFを含むことを確認する。

【0029】4) 組換え体の作製および発現の誘導

2)の増幅産物に、等量の1 M トリス飽和フェノール/クロロホルム混液(フェノール500 ml、クロロホルム480 ml、イソアミルアルコール20 ml、8-キノリノール1 g及び2-メルカプトエタノール2 mlの混合液を1 M トリス水溶液(pH未調整)で飽和したもの)を加え、攪拌後、遠心分離(12,000×g、2分間)し、水層を回収し(以下、この操作を「フェノール/クロロホルム抽出」という)、さらにエタノール沈殿により濃縮し、1%アガロース(TAE緩衝液)ゲル電気泳動した後、NaI及びガラスビーズを用いた方法で目的のDNA断片を回収した。回収したDNA断片1 µgを、NcoI及びXhoIで切断した後、フェノール/クロロホルム抽出およびガラスビーズ法で回収し、5 µlのTE緩衝液(10 mM トリス-塩酸、1 mM EDTA、pH 8.0)に溶解してcDNA溶液

とした。

【0030】別に、pET-16bベクター(Novagen) 3 μ gをNcoI及びXhoIで切断し、CIAP 27単位で50℃で30分間脱リン酸化処理し、フェノール/クロロホルム抽出およびガラスビーズ法で回収し、30 μ lのTE緩衝液に溶解し、プラスミドDNA溶液とした。

【0031】このプラスミドDNA溶液1 μ l、上記cDNA溶液1 μ l、ライゲーションA液(宝酒造)16 μ l及びライゲーションB液(宝酒造)2 μ lを混合して、16℃で一晩、反応させ、目的とするRNA2由来のORFをコードする遺伝子をpET-16bベクターのNcoI及びXhoI部位に導入した組換プラスミドpET-SJ213を得た。

【0032】このようにして得られた組換プラスミドpET-SJ213を、まず、公知の方法で大腸菌DH5 α コンピテント細胞に導入してクローニングし、プラスミドクローンを大腸菌DH5 α と同様の方法で調製した発現用の大腸菌BL21(DE3)のコンピテント細胞に形質転換した。次に、この形質転換菌は、LMA寒天培地(1.5gバクトートリブシン、0.75gバクトーイーストエキストラクト、及び88mg NaClを150mlの蒸留水に溶解し、オートクレープで滅菌後、50℃前後に冷却したものに、1M MgSO₄水溶液 1.5ml及び50 μ g/ml アンピシリンを加えたもの)で培養した後、ディスラブション法によるDNA断片の挿入の有無を確認すると共に、スモールスケール法でプラスミドDNAを回収し、制限酵素切断によって解析し、スクリーニングした。得られた組換大腸菌は、LMA寒天培地で37℃で一晩培養した後、その単一コロニーを50 μ g/mlのアンピシリンを含むLB培地に接種し、37℃で対数増殖期前期(OD₆₀₀ = 0.6)まで培養した後、最終濃度1mMになるようにIPTGを加え、さらに3時間培養して、発現の誘導を行った。

【0033】5) 発現タンパク質のウェスタンブロット法による解析

4)において発現が誘導された菌体を遠心回収し、TE緩衝液に懸濁後、1/3容の4 \times クラッキングバッファー(250mM トリス-塩酸、pH6.8、8% SDS、8% 2-メルカプトエタノール、40% グリセロール、0.04% ブロモフェノールブルー)を混合した後、3分間煮沸し、泳動用サンプルとした。この泳動用サンプルを、10%あるいは12.5%ポリアクリルアミドゲルを用い、電気泳動し、タンパク質をウェスタンブロット法によりゲルからニトロセルロース膜に転写した。次に、ニトロセルロース膜に抗SJNNVウサギ血清あるいはそれから精製しベブシン消化により作製されたビオチン標識ウサギIgG F(ab')₂フラグメントを、次にアルカリホスファターゼ標識ブタ抗

体(DAKO)を作用させ、これに発色液としてアルカリホスファターゼ発色用緩衝液(100M トリス-塩酸、pH9.5、100mM NaCl、50mM MgCl₂) 10mlに50mg/mlのX-リン酸溶液35 μ l、75mg/mlのNTB溶液45 μ lを添加して発色させて、目的とするタンパク質の発現を確認した。

【0034】このようにして得られた組換プラスミドpET-SJ213が導入されシマアジのウイルス性神経壊死症ウイルス(SJNNV)由来の組換外被タンパク質を発現する微生物は、EX-SJ213という名称で、受託番号FERM P-16755号で、平成10年4月3日付で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託された。

【0035】6) 発現タンパク質の精製

5)で発現の誘導が確認された組換大腸菌菌体を遠心回収した後、溶菌用緩衝液(50mM トリス-塩酸、pH8.0、2mM EDTA、0.1%トリトンX-100)に懸濁し、リゾチーム(Sigma)を最終濃度100 μ g/mlになるように添加して、30℃で15分間反応させた。超音波処理により菌体を完全に破壊して、遠心分離(12,000 \times g、15分間)し、沈殿を溶菌用緩衝液で3回、遠心、洗浄して得られた沈殿を封入体画分とした。封入体画分をさらに8M尿素を含む可溶化用緩衝液(30mM トリス-塩酸、pH7.5、30mM NaCl、1mM DTT)に溶解し、4M尿素を含む可溶化用緩衝液中で6時間、可溶化用緩衝液中で24時間透析した後、遠心分離(12,000 \times g、15分間)し、上清を可溶性画分とした。

【0036】この結果、4)で得られたpET-SJ213を含む組換大腸菌において、ウイルス構造タンパク質と同じ大きさ(42kDa)のタンパク質の発現が認められ(図1A)、このタンパク質はウェスタンブロットにより抗SJNNVウサギ血清と反応した(図1B)。なお、図1において、レーン1、2及び3は、それぞれ、SJNNVの外被タンパク質；発現を誘導されない組換大腸菌；および発現が誘導された組換大腸菌である。また、この発現タンパク質は、顕微鏡で確認可能な大きさの封入体を形成しており、SDS-PAGEの結果、封入体画分にかなり純粋な形で存在しており(図2)、100mlの培養液から45mgの封入体を得られた。また、封入体を尿素で可溶化した可溶性画分にも、一部可溶化したものが認められ(図2)、100mlの培養液から2mgの可溶化タンパク質が得られた。なお、図2において、レーン1、2及び3は、それぞれ、封入体画分、不溶性画分及び可溶性画分である。

【0037】上記実施態様において、PCRプライマーとして、SJNNV外被タンパク質遺伝子(RNA 2；"Journal of General Virology" (1995), 76, 1563-1569 参照)の塩基配列をもとに作製した下記表1に示

される2つの上流プライマー及び3つの下流プライマー *【0038】
 を使用してもよい。これらはいずれも20塩基からな 【表1】
 り、GCは55%でかつT_mは64～65℃であった。*

プライマー	配列	位置*	GC(%)	T _m (℃)
F1	5'-GGATTGGACGTGCGACCAA-3'	155-174	55	65.4
F2	5'-CGTGTCACTCATGTGTCGCT-3'	604-623	55	64.5
R1	5'-GACAAGACTGGTGAAGCTGG-3'	1302-1283	55	64.8
R2	5'-CAACAGCGTATCGCTGGAAG-3'	339-310	55	63.6
R3	5'-CGAGTCAACACGGGTGAAGA-3'	1030-1011	55	64.4

*: SJNNV RNA2のヌクレオチド番号

【0039】上記実施態様において、F1、F2、及び
 R1～R3をPCRプライマーとして使用（この際、
 2）PCRによる核酸の増幅において、Taq DNA
 ポリメラーゼ（Perkin-Elmer）の代わりに
 Tth version 2.0 DNAポリメラーゼ
 （TOYOBO）を使用してもよい）することによっ
 て、様々な領域がさらにターゲットされ増幅される。例
 えば、上流プライマーF1と下流プライマーR1を用い
 ることによりT1領域（1148bp）が、上流プライ
 マーF1と下流プライマーR3を用いることによりT2
 領域（876bp）が、上流プライマーF2と下流プ
 ライマーR1を用いることによりT3領域（699bp）
 が、上流プライマーF2と下流プライマーR3を用い
 ることによりT4領域（427bp）が、および上流プ
 ライマーF1と下流プライマーR2を用いることによりT
 5領域（175bp）が、それぞれ、ターゲットされ増
 幅される。プライマーF1、F2、R1、R2及びR3
 と、増幅産物T1～T5領域との関係を図3に示す。こ
 れらの増幅産物、T1～T5領域を上記と同様にしてア
 ガロースゲル電気泳動及びサザンブロットを行ったと
 ころ、T1からT5までのすべての領域で予想された大き
 さのDNAの増幅が確認され、RNA2のcDNAとの
 相補性も認められた。さらに、これらのプライマーのう
 ちT4領域をターゲットとして、ウイルス核酸の10倍
 希釈列を作製し（100pg～1fg）、検出を行ない
 その限界も調べた結果、PCRでは100fgのウイル
 ス核酸より目的領域の増幅が可能であった。加えて、上
 記で作製したシマアジ病魚および健康魚の核酸試料につ
 いて、T4領域の増幅を行い検出を行なったところ、感
 染病魚のみから目的の産物が得られ、サザンブロットに
 よりその特異性が確認された。

【0040】本発明において、発現ベクターとしては、
 上記実施態様で使用されたpET-16b（Novagen）に加えて、pRIT2T（Pharmacia）
 やpET-25b（Novagen）を始めとする既知
 のベクターシステムが使用される。これらのうち、pE
 T-16bは、T7ファージプロモーターとT7RNA

ポリメラーゼを用いる発現系に用いられるベクターで、
 発現効率が極めて良いという利点を持ち、またプロモ
 ーターの下流の翻訳開始コドンはNcoI認識部位上にあ
 り、外被タンパク質遺伝子をこの部位にクローニングす
 ることにより遺伝子産物の直接発現が可能であるため、
 好ましく使用される。また、pRIT2Tは、プロテイン
 AのIgG結合領域との融合タンパク質として発現さ
 せるベクターであり、産物をIgG Sepharoseにより容易に精製できるという利点を有するため、や
 はり好ましく使用される。

【0041】上記実施態様において、pET-16bの
 代わりにpRIT2T（Pharmacia）を発現ベ
 クターとして使用した際には、上記実施態様のうち、
 4）組換体の作製および発現の誘導、および6）発現タ
 ンパク質の精製の項がpET-16bベクター（Nov
 agen）を使用する際と異なるので、pRIT2Tを
 発現ベクターとして使用する際の実施態様を、これらの
 項についてのみ具体的に以下に説明する。

【0042】4）組換体の作製および発現の誘導
 pBSJ-69 DNAをEcoRIで切断し、これを
 1%アガロース（TAE緩衝液）ゲル電気泳動した後、
 NaIとガラスビーズを用いた方法によってcDNAを
 含む断片を回収した。このcDNA断片混合物をTE緩
 衝液に溶解してcDNA溶液とした。なお、この際使
 用されたpBSJ-69は、SJNNVRNA2の塩基
 番号13～1302番のcDNAの両端にEcoRIリ
 ンカー（AATTCGCGGCCGCT）を付加した
 後、EcoRIで消化し、得られたEcoRI断片をp
 BluescriptII（Stratagene製）のEcoR
 I部位に挿入することによって製造される。

【0043】別途、pRIT2Tベクター（Pharm
 acia）をEcoRIで切断した後、反応液に1/1
 0容の3M酢酸ナトリウム（pH5.2）および2.5
 容のエタノールを加え、エタノール沈殿を行った。この
 DNA沈殿を100mM トリス塩酸緩衝液（pH8.
 0）に溶解した後、DNA 1μgに対してCIPA2
 0単位を加え、50℃で30分間反応させ、脱リン酸化

を行った後、フェノール/クロロホルム抽出を行い、ガラスビーズ法によりDNAを回収し、TE緩衝液に溶解し、プラスミドDNA懸濁液とした。

【0044】上記で得られたcDNA懸濁液(0.1 μg/μl) 1 μl、このプラスミドDNA懸濁液(0.05 μg/μl) 1 μl、ライゲーションA液(宝酒造) 16 μl及びライゲーションB液(宝酒造) 2 μlを混合して、16℃で一晩、反応させ、目的とする遺伝子をpRIT2TベクターのEcoRI部位に導入した組換プラスミドpRIT-SJを得た。

【0045】このようにして得られた組換プラスミドpRIT-SJを、公知の方法を用いて調製した大腸菌N4830-1のコンピテント細胞に形質転換させた。形質転換菌は、LMA寒天培地で温度感受性リプレッサーの働く30℃で培養し、得られたクローンはディスラブション法によるDNA断片の挿入の有無を確認すると共に、スモールスケール法でプラスミドDNAを回収し、制限酵素切断によって解析し、スクリーニングした。得られた組換体大腸菌は、50 μg/mlのアンピシリンを含むLB培地で30℃で対数増殖期前期(OD₆₀₀ = 0.6)まで培養した後、54℃で保温しておいた等容の50 μg/mlのアンピシリンを含むLB培地を加え、さらに42℃で3時間培養して、発現の誘導を行った。

【0046】6') 発現タンパク質の精製

5)で発現の誘導が確認された菌体培養液を遠心分離(500×g、5分間)して菌体を回収し、これに培養液の1/10容のTST緩衝液(50 mM トリス-塩酸(pH 7.6)、150 mM NaCl、0.05% ツィーン20)を加え、冷却しながら超音波処理を施して菌体を完全に破壊した。この破壊菌体液を遠心分離(18,000×g、20分間)し、その上清を回収してこれに4倍容のTST緩衝液を加えた。これを4℃で10分間放置後、さらに遠心分離(10,000×g、10分間)し、上清を回収した。この上清を、TST緩衝液で平衡化したIgGセファロース6ファーストフローゲル(IgG Sepharose 6 fast flow gel)(Pharmacia)を充填したカラムに吸着させた後、5 mM 酢酸アンモニウム(pH 5.0)で溶出させ、リン酸緩衝液中で透析することにより、目的とする発現タンパク質を精製した。

【0047】この結果、4')で得られたpRIT-SJを有する組換大腸菌において、予想された約70 kのプロテインAとの融合タンパク質が認められ、また、この融合タンパク質は、ウェスタンブロットにより抗SJNNVウサギIgG F(ab')₂、フラグメントと反応した(図4)ことから、SJNNV由来のウイルス外被タンパク質の発現が確認された。なお、図4において、レーン1、2及び3は、それぞれ、SJNNVの外被タンパク質; pRIT2Tが形質転換された組換大腸

菌; およびpRIT-SJが形質転換された組換大腸菌である。さらに、この発現タンパク質は、可溶性画分に認められ、IgGセファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーで回収したところ、1リットルの菌体培養液から5~10 mgの発現タンパク質が得られた。

【0048】本発明の他の実施態様によると、マツカワのウイルス性神経壊死症ウイルス(BFNNV)由来の組換外被タンパク質が作製される。BFNNV由来の組換外被タンパク質の作製方法の一例を以下に説明する。

【0049】a) BFNNVの核酸の調製
SJNNVにおける1)において、ウイルスとしてBFNNVを使用する以外は、SJNNVにおける1)と同様である。

【0050】b) PCRによる核酸の増幅

上記a)で得られた核酸試料を90℃で5分間加熱後水中で急冷し、20 μlの反応液(10 mM トリス-塩酸(pH 8.3)、50 mM MgCl₂、各デオキシヌクレオチド三リン酸(dNTP; Pharmacia) a)、0.5 μM下流プライマー、500 U M-MLV逆転写酵素(USB)、20 U RNaseインヒビター(TOYOBO))中で42℃、30分間逆転写反応を行なった後、99℃で10分間加熱した。この反応液に対し5倍容のPCR溶液(10 mM トリス-塩酸(pH 8.3)、50 mM KCl、2 mM MgCl₂、0.1 μM 上流プライマー、2.5 U Tth version 2.0 DNAポリメラーゼ(TOYOBO))を加え、自動温度シークエンス装置(Astec PC-700)を用いて72℃で10分間、さらに95℃で2分間、反応後、95℃で1分間、55℃で1分間、および72℃で1分間の一連の反応を30サイクル行なった後、72℃で5分間反応させることにより、BFNNVの外被タンパク質遺伝子(RNA2)からオープンリーディングフレーム(ORF)の一部を含む目的領域(875 bp)を増幅した。この際、上流(センス)プライマーとしては、NdeI認識配列を付加した5'-aaacatatagGGATTTGGACGTGCGACCAA-3'を、および下流(アンチセンス)プライマーとしては、HindIII認識配列を付加した5'-TCTTCAACCCGTGTTGACTCGtgaagcttagc-3'を、それぞれ使用する。

【0051】c) PCR産物の解析

SJNNVにおける3)において、2)で得られた増幅産物の代わりにb)で得られた増幅産物を使用する以外は、SJNNVにおける3)と同様である。

【0052】d) 組換体の作製および発現の誘導

SJNNVにおける4)において、2)で得られた増幅産物の代わりにb)で得られた増幅産物を使用し、制限酵素としてNdeI及びHindIIIを使用し、さら

に、プラスミドとしてpET-25bベクター(Novagen)を使用する以外は、SJNNVにおける4)と同様にして、BFNNVの外被タンパク質をコードする目的遺伝子をpET-25bベクターのNdeI及びHindIII部位に導入した組換プラスミドpET-B203を得た。

【0053】このようにして得られた組換プラスミドpET-B203を、まず、公知の方法で発現用の大腸菌BL21(DE3)のコンピテント細胞に形質転換した。次に、この形質転換菌は、アンピシリン(50μg/ml)を加えたLB培地で37℃で3時間、振盪培養する。この培養物を遠心分離(3,000rpm、5分)により集菌し、集めた菌を、再び、アンピシリン(50μg/ml)を加えたLB培地で37℃で3時間、振盪培養し、得られたクローンは制限酵素切断によって解析し、スクリーニングした。得られた組換体大腸菌を、50μg/mlのアンピシリンを含むLB培地中で対数増殖中期まで、37℃で振盪培養し、最終濃度が1mMになるようにIPTGを添加し、さらに3時間培養して、発現の誘導を行った。

【0054】e)発現タンパク質のウェスタンブロット法による解析

d)で得られた組換大腸菌を超音波処理により破壊し、破壊菌体液の可溶性画分と不溶性画分にSDS-PAGE用試料緩衝液を添加して、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(12%ポリアクリルアミド)に供した後、ウェスタンブロット解析を行った。すなわち、電気泳動後、トランスファーバッファー(50mM トリス、200mM グリシン)中で、50V、1時間の条件(電極距離4cm)で電氣的にニトロセルロース膜(0.45μm、ADVANTEC)に転写した。転写後、ブロッキング液(20mM トリス-塩酸(pH 7.5)、500mM NaCl、3% スキムミルク)に30分間、浸漬し、500倍希釈の抗SJNNVウサギ血清を1時間、さらに1000倍希釈のペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgGブタ抗体を1時間、反応させた後、発色液(0.5mg/ml 3,3'-ジアミノベンジジン、テトラクロライド(DAB)、0.05% H₂O₂、20mM トリス-塩酸、pH 7.5、500mM NaCl)中で数分間発色させて、目的とするタンパク質の発現を確認した。

【0055】このようにして得られた組換プラスミドpET-B203が導入されマツカワのウイルス性神経壊死症ウイルス(BFNNV)由来の組換外被タンパク質を発現する微生物は、EX-B203という名称で、受託番号FERM P-16754号で、平成10年4月3日付で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託された。

【0056】f)発現タンパク質の精製

e)で発現の誘導が確認された組換大腸菌を遠心分離

(5,000rpm、5分)により集菌し、集めた菌を炭酸重炭酸緩衝液(pH 9.6)中に懸濁し、この懸濁液にリゾチームを100mg/mlとおよびトリトンXを0.1%となるようにそれぞれ添加し、30℃で30分間、保持する。菌体を超音波処理により破壊し、破壊菌体液を遠心分離(1,200rpm、15分)することにより、目的とする組換タンパク質を回収する。最後に、この組換タンパク質を炭酸重炭酸緩衝液(pH 8.0)で3回、洗浄する。

【0057】この結果、d)で得られた組換大腸菌において、ウェスタンブロットにより抗SJNNVウサギ血清と反応するタンパク質は不溶性画分に存在し、このタンパク質はブライマーセットから算出された分子量と同じ大きさ(32kDa)であった。また、この発現タンパク質は、不溶性画分に認められ、1リットルの菌体培養液から約700mgの発現タンパク質が得られた。

【0058】本発明のさらなる他の実施態様によると、ヒラメのウイルス性神経壊死症ウイルス(JFNNV)由来の組換外被タンパク質が作製される。この際、JFNNV由来の組換外被タンパク質の作製方法は、ウイルスとしてJFNNVを使用する以外は、BFNNVを用いる方法と同様である。

【0059】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0060】実施例1

組換プラスミドpET-SJ213が導入されSJNNV由来の組換外被タンパク質を発現する組換大腸菌EX-SJ213(受託番号:FERM P-16755号)を、LMA寒天培地で37℃で一晩培養した後、その単一コロニーを50μg/mlのアンピシリンを含むLB培地に接種し、37℃で対数増殖期前期(OD₆₀₀=0.6)まで培養した後、最終濃度1mMになるようにIPTGを加え、さらに3時間培養して、発現の誘導を行った。

【0061】次に、この菌体を遠心回収した後、溶菌用緩衝液に懸濁し、リゾチーム(Sigma)を最終濃度100μg/mlになるように添加して、30℃で15分間反応させた。超音波処理により菌体を完全に破壊して、遠心分離(12,000×g、15分間)し、沈殿を溶菌用緩衝液で3回、遠心、洗浄して得られた沈殿を封入体画分とした。封入体画分をさらに8M尿素を含む可溶化用緩衝液に溶解し、4M尿素を含む可溶化用緩衝液中で6時間、可溶化用緩衝液中で24時間透析した後、遠心分離(12,000×g、15分間)し、上清を可溶性画分とした。

【0062】実施例2

(社)日本栽培漁業協会 五島事業場で飼育されていた平均全長42.5cm、平均体重1.02kgのシマアジ成魚を各試験区につき5尾ずつ(それぞれ、個体標識

したもの) 供試した。飼育は同事業場の海上生け簀にて行い(1994年10月から12月、水温、約20℃)、飼料として適宜モイストペレットを与えた。

【0063】実施例1で得られた封入体画分を2mg/mlとなるように、および実施例1で得られた可溶性画分を0.2mg/mlとなるようにPBSで希釈したものに等容の完全フロイントアジュバント(Difco)を加え、超音波処理により混合液を作製した。次に、これらを、それぞれ、供試魚に、1尾当たり500μlずつ筋肉内接種した(初回の接種)。対照区には、PBSを同様に処理し、接種した(コントロール)。初回の接種から20日、27日、及び55日目に、実施例1で得られた封入体画分を0.2mg/mlとなるように、および実施例1で得られた可溶性画分を50μg/mlとなるようにそれぞれPBSで希釈したものを、1尾当たり500μlずつ、筋肉内接種した(対照区では、PBSを500μl接種)。初回の接種から60日目に、供試魚を採血して免疫血清を得た。また、初回、27、34及び60日目に各個体の尾静脈から採血を行い、以下の実施例3における血清の抗ウイルス抗体価の測定に使用した。なお、初回接種直前に各個体から採血して得た血清をそれぞれの免疫前血清とした。

【0064】実施例3

マイクロプレートに1ウェル当たり純化SJNNV懸濁液(2μg/ml)100μlを接種し、37℃で2時間吸着させた。ブロックエース(大日本製薬)でブロッキングした。次に、実施例2で得られた各血清(初回、27、34及び60日目に各個体の尾静脈から採血されたものから調製)をPBSTで1000倍に希釈した溶液を200μl接種し、25℃で4時間反応させた。各ウェルを洗浄した後、PBSTで1000倍に希釈した抗シマアジIgMウサギ血清と37℃で2時間、さらにPBSTで3000倍に希釈したアルカリホスファターゼ標識抗ウサギIgGブタ抗体(DAKO)と37℃で2時間反応させた後、1mg/mlのp-ニトロフェニルリン酸を含むジエタノールアミン液を加え、1時間後に405nmで吸光度を測定し、本発明による封入体画分及び可溶性画分の抗ウイルス抗体値を調べた。

【0065】結果を図5に示す。図5において、図5Aは本発明による封入体画分で免疫処理された魚に関する抗SJNNV抗体の検出結果を示し、図5Bは本発明による可溶性画分で免疫処理された魚に関する抗SJNNV抗体の検出結果を示し、および図5CはコントロールとしてPBSを接種された魚に関する抗SJNNV抗体の検出結果を示す。

【0066】図5に示されるように、抗体価に個体差は認められたが、封入体画分及び可溶性画分の発現タンパク質を接種したシマアジではいずれも抗ウイルス抗体の産生が認められた。また、コントロールとしてのPBS接種魚では、抗体価の上昇は認められなかった。

【0067】実施例4

実施例2で得られた各免疫血清および免疫前血清200μlに対して、500μlのPBS及び300μlの飽和硫酸アンモニウムを加え、4℃で2時間、静置後、遠心分離(1,200×gで10分間)して、上清を回収した。この上清に、400μlの飽和硫酸アンモニウムを加え、4℃で2時間、静置後、同様に遠心分離した。得られた沈殿を200μlのPBSに懸濁したものを抗体液として、これに純化SJNNV 1μgを含む500μlのPBSを加えた。室温で1時間混合後、シマアジ仔魚(孵化後1日)を250尾収容したピーカー(海水1リットル)に添加した。各試験区から毎日5尾ずつ6日間サンプリングした。感染の有無は、上記発明の実施の形態における純化ウイルスの病原性試験の項で述べたのと同様のELISAにより、確認し、本発明による封入体画分及び可溶性画分のウイルス中和能を調べた。なお、対照区では、実施例2において対照区として得られた血清を用いた(PBS-アジュバント接種区)。

【0068】結果を図6に示す。なお、図6において、A-1、B-1及びC-1は免疫前血清を用いた際の結果を示し、A-1において、白塗りの三角はウイルスを添加しなかった区を、および黒塗りの丸は未処理ウイルス(PBSで処理したウイルス)を添加した区を示し、A-2、B-2及びC-2は、それぞれ、実施例1で得られた封入体画分を用いた免疫血清、実施例1で得られた可溶性画分を用いた免疫血清、及びコントロール(PBS-アジュバント接種区)の結果を示す。また、図6において、黒塗りの四角、白塗りの四角、黒塗りの菱形、白塗りの菱形、及び黒塗りの三角は、5尾の供試魚それぞれの結果を示す。

【0069】図6 A-1に示されるように、未処理ウイルスを添加した区(陽性対照;黒塗りの丸)では4日目に急激な吸光度の上昇と共にすべての供試魚が死亡したが、ウイルスを添加しなかった区(陰性対照;白塗りの三角)では6日目まで吸光度の上昇は認められなかった。また、各免疫区における免疫前血清(図6;A-1、B-1)または対照区の血清(PBS-アジュバント接種区;図6;C-1、C-2)で処理したウイルスを添加した場合は、接種後3日から6日の間に低いものでも0.3以上の吸光度の上昇が認められた。これに対して、発現タンパク質で免疫60日後の血清で処理したウイルスを添加した区では、いずれも吸光度の上昇はほとんど認められず、吸光度が高いものでも0.1以下であった(図6;A-2、B-2)。

【0070】実施例5

組換えプラスミドpET-B203が導入されBFNNV由来の組換え外被タンパク質を発現する組換え大腸菌である、大腸菌EX-B203(受託番号:FERMP-16754号)を50μg/mlのアンピシリンを含むLB培地中で37℃で3時間振盪培養し、この培養液を遠

心分離(5,000rpm、5分)により集菌し、集めた菌を炭酸重炭酸緩衝液(pH9.6)中に懸濁し、この懸濁液にリゾチームを100mg/mlとおよびトリトンXを0.1%となるようにそれぞれ添加し、30℃で30分間、保持する。菌体を超音波処理により破壊し、破壊菌体液を遠心分離(1,200rpm、15分)することにより、目的とする組換タンパク質を回収する。最後に、この組換タンパク質を炭酸重炭酸緩衝液(pH8.0)で3回、洗浄し、本発明による組換BFNNV外被タンパク質を調製した。

【0071】比較例1

凍結したSJNNVの感染病魚60gに2倍量の2mM 2-メルカプトエタノールを含む緩衝液(0.1M トリス-塩酸、1mM EDTA、pH7.2)を加え、冷却しながら15分間ブレンダーで磨砕した。最終濃度が25%になるように、クロロホルムを加えて激しく攪拌し、遠心分離(8,000×g、20分間、4℃)後、水層を回収した。水層を高速遠心分離(100,000×g、2.5時間、4℃)を行い、得られた沈殿に同緩衝液を加えた。4℃で一晩放置して、ウイルス粒子を浮遊させ、その浮遊液を遠心分離(8,000×g、15分間、4℃)して、不溶物を沈殿させ、上澄を回収した。この高速遠心分離および遠心分離の操作を3回繰り返し、得られた濃縮ウイルス液を、10~40%(w/v)ショ糖密度勾配に重層して、16℃で80,000×gで2時間、遠心した。中央付近に現れたウイルスバンドを回収し、これに5倍量の緩衝液を加え、遠心分離(100,000×g、2.5時間、4℃)により、濃縮した。さらに、30~40%(w/v)塩化セシウム密度勾配平衡遠心(210,000×g、16時間、16℃)を行い、中央部に現れたウイルスバンドを回収して、緩衝液に懸濁後、遠心分離して濃縮することにより、純化SJNNVを得た。

【0072】実施例6

以下の実験を行い、ELISAの反応性を比較することにより本発明の組換BFNNV外被タンパク質の抗原性を検討した。

【0073】供試魚の血液を、19Gの針をつけたシリンジを用いて、尾柄部から採取し、1.5ml容のチューブに移した。これを血餅が形成されるまで室温で放置し、7,000×gで5分間遠心し、上清を供試魚血清試料とした。

【0074】タンパク質濃度が10μg/mlとなるよ

うに炭酸重炭酸緩衝液(pH9.6)で希釈された比較例1の純化SJNNV及び実施例5の組換BFNNV外被タンパク質を、それぞれ、50μlずつ、ELISA用マイクロプレート(greiner)の各ウェルに分注して、これを4℃で一晩静置し、抗原をプレートに固定した。次に、0.05%ツィーン20を含むPBS(PBS-T)でウェルを3回洗浄し、2%FBSまたはスキムミルクを含むPBS-Tを50μl/ウェルずつ添加し、37℃で1時間反応させた。反応液を捨て、PBS-Tでウェルを3回洗浄した後、PBS-Tで1:40に希釈した供試魚血清試料を各ウェルに50μlずつ添加して、37℃で2時間反応させた。反応終了後、反応液を捨て、ウェルをPBS-Tで3回洗浄し、PBS-Tで希釈した抗マツカワウサギ血清を50μl/ウェルずつ分注し、さらに37℃で1時間反応させた。再度、反応液を捨て、ウェルをPBS-Tで3回洗浄した後、PBS-Tで1:500に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体(peroxidase conjugated swine immunoglobulins to rabbit immunoglobulin)を50μl/ウェルずつ分注し、37℃で30分間反応させた。反応液を捨て、PBS-Tでウェルを5回洗浄した。さらに、各ウェルに、o-フェニレンジアミンを10mg/100mlの濃度となるようにクエン酸緩衝液(0.2M Na₂HPO₄、0.1Mクエン酸、混合比;103:97(v/v))に溶解したものに最終濃度が0.03%となるようにH₂O₂を加えた基質発色液を、50μl/ウェルずつ加え、室温で15分間、暗所で反応させることにより、発色させた。2NH₂SO₄を50μl/ウェルずつ添加して、反応を終了させ、各ウェルについて492nmの吸光値を測定した。なお、本実験は、2連で行った。

【0075】結果を表2に示す。表2に示される結果から、本発明の組換BFNNV外被タンパク質を抗原として使用した際の吸光値は純化SJNNV粒子を抗原として用いた場合とほぼ同程度の吸光値であった(即ち、同等の反応性を示す)が、純化SJNNV粒子を用いた場合には2ウェル間の吸光値のばらつきが大きく、かつ若干高い値を示した。これらの結果から、本発明の組換外被タンパク質を用いることにより、SJNNV粒子に比して、親魚の選別に用いるELISAの抗原としてより明瞭な結果が得られることがわかった。

【0076】

【表2】

魚番号	吸光値 (492nm) × 1000			
	純化SJNNV粒子		組換外被タンパク質	
236	168	105	177	169
310	306	170	118	125
764	205	198	133	125
5775	186	316	224	229
305	42	54	48	52
821	66	62	66	70
5120	61	67	39	38

【0077】実施例7

実施例5と同様にして調製された組換BFNNV外被タンパク質を250μg/mlとなるようにTE緩衝液(pH8.0)に懸濁し、注射器を用いてマツカワの筋肉内、鰭基部及び腹腔内に、それぞれ、1mlずつ注射した後、2週間、1カ月及び2カ月後、さらに尾柄部血管内に同量注射した。1回目の注射実施時、1カ月、2カ月及び3カ月後に採血し、抗VNNウイルス抗体価を測定するELISAを行なって、本発明のタンパク質の抗原性の確認を行なった。この際、ELISA法は、抗原として外被タンパク質を用いた以外は、実施例6で用いた方法と同様であった。また、マツカワの血清は1:5~1:5120まで希釈してELISAを行ない、吸光度がベースラインの値となる最大希釈倍率を算定した。この最大希釈倍率をELISA抗体価とした。採血と血管内への抗原の接種を同時に行なう際には、採血用のシリンジと抗原溶液の入ったシリンジを三方活栓(テルモ株式会社製)を用いて連結し、採血を行なった後、同一の針で抗原接種を行なった。対照群としては腹腔内にTE緩衝液を(pH8.0)を1mlずつ注射した。

【0078】外被タンパク質で免疫したマツカワのELISA抗体価を図7に示した。図7に示されるように、免疫前及び対照区のELISA抗体価は1:20以下であったが、免疫した区では3カ月後には1:80~1:5120まで上昇した。初回の、免疫部位別では、腹腔内に接種した群ではELISA抗体価の上昇が低めであった。したがって、本発明の組換外被タンパク質をマツカワに免疫することにより抗体価の上昇が認められるため、本発明の組換外被タンパク質は仔稚魚及び親魚の免

疫用抗原として有効に使用できることが示される。

【0079】実施例8

ELISAにより測定された抗ウイルス抗体価に基づいて各親魚を選別し、同様の抗体価を示す個体ごとに隔離して水槽に收容して、親魚養成を行なった。ELISAは、実施例6に記載されるのと同様の方法にして、SJNNV粒子及び組換外被タンパク質を用いた。

20 【0080】ELISAによる選別の効果を検証するために、RT-PCR法によるVNNウイルス遺伝子の検出を、人工受精の際に得られた未受精卵及び精液、受精卵からふ化した仔魚について、2回、行なった。

【0081】第一回目の結果を表3及び表4に示す。表3及び表4から示されるように、抗体価が1:40以下の個体が35尾であり、抗体価が1:40を越える個体が2尾であった。また、親魚の卵及び精液からウイルス遺伝子は検出されなかったが、1尾の仔魚でVNNが発生した。

30 【0082】第二回目の結果を表5及び表6に示す。表5及び表6から示されるように、抗体価が1:20の個体が20尾、1:40の個体が20尾、および1:40を越える個体が1尾であった。また、親魚の卵及び精液からウイルス遺伝子は検出されず、仔魚からもVNNウイルス遺伝子は検出されなかった。

【0083】以上のことから、外被タンパク質を用いたELISAにより親魚を選別することは、マツカワのVNNの防除に有効であることが分かった。

【0084】

40 【表3】

由来	ELISA抗体値		産卵期 PCR	
	1:≤40	1:>40	陰性	陽性
天然	9	0	9	0
天然	3	0	3	0
人工生産魚	6	0	6	0
人工生産魚	8	1	9	0
人工生産魚	9	1	10	0
合計	35	2	37	0

【0085】

* * 【表4】

雌		雄		仔魚
由来	PCR	由来	PCR	PCR
天然	-	天然	-	-
天然	-	天然	-	-
天然	-	天然	-	-
人工生産魚	-	人工生産魚	-	-
人工生産魚	-	人工生産魚	-	+
人工生産魚	-	人工生産魚	-	-
人工生産魚	-	人工生産魚	-	-

【0086】

※ ※ 【表5】

由来	ELISA抗体値			産卵期 PCR	
	1:20	1:40	1:>40	陰性	陽性
天然	10	0	0	10	0
人工生産魚	10	0	0	10	0
人工生産魚	0	6	0	6	0
人工生産魚	0	4	0	4	0
人工生産魚	0	6	0	6	0
天然	0	4	1	5	0
合計	20	20	1	41	0

【0087】

★ ★ 【表6】

雌		雄		仔魚
由来	PCR	由来	PCR	PCR
人工生産魚	-	人工生産魚	-	-
天然	-	天然	-	-
天然	-	天然	-	-
天然	-	天然	-	-
天然	-	天然	-	-

【0088】

ルスの組換え外被タンパク質は、ELISAの抗原として
 【発明の効果】上述したように、本発明の魚類ノダウイ 50 使用される際に、天然のウイルス粒子と同様の反応性を

保持しつつばらつきを抑えるため、ELISAの抗原として有効に使用できる。したがって、本発明の魚類ノダウイルスの組換え外被タンパク質は、ウイルス性神経壊死症ウイルスによる魚類の疾病を検査できる当該抗体検出用ELISAの抗原として有効に使用できる。

【0089】また、本発明の魚類ノダウイルスの組換え外被タンパク質をELISAの抗原として使用して、親魚を選別し、人工受精を行うことにより、ウイルスを保有しない種苗生産が可能になり、これにより、養殖による大量生産が可能になる。

【0090】さらに、本発明の魚類ノダウイルスの組換え外被タンパク質を魚に免疫処理することにより、免疫処理魚の抗体価を上昇させる。したがって、本発明の魚類ノダウイルスの組換え外被タンパク質はノダウイルスに対する有効なワクチンとして使用できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1Aは、pET-SJ213を形質転換した組換え大腸菌による発現タンパク質のSDS-PAGE分析結果を示すものであり、図1Bは、pET-SJ213を形質転換した組換え大腸菌による発現タンパク質のウ*20

* ウェスタンブロット分析結果を示すものである。

【図2】図2は、pET-SJ213を形質転換した組換え大腸菌による発現タンパク質の封入体画分、不溶性画分及び可溶性画分のSDS-PAGE分析結果を示すものである。

【図3】図3は、PCR増幅用プライマーF1、F2、R1、R2及びR3と、増幅産物T1～T5領域との関係を示す概略図である。

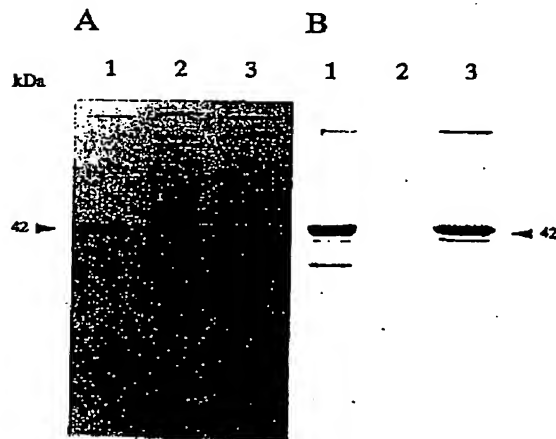
【図4】図4は、pRIT-SJで形質転換された組換え大腸菌で発現が誘導された融合タンパク質のウェスタンブロット分析結果を示すものである。

【図5】図5は、実施例3において免疫期間中に採血した個体別血清の抗ウイルス抗体価を測定した結果を示す図である。

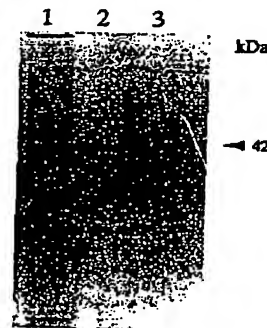
【図6】図6は、実施例4においてウイルス接種後のシマアジ仔魚からのELISAによるウイルス抗原の検出結果を示す図である。

【図7】図7は、実施例7において組換え外被タンパク質で免疫したマツカワのELISA抗体価を示す図である。

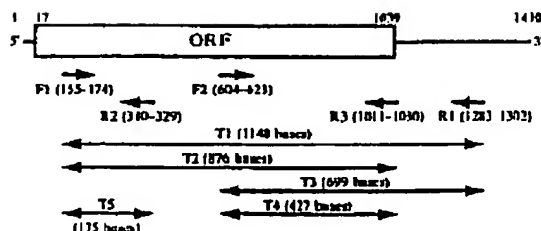
【図1】



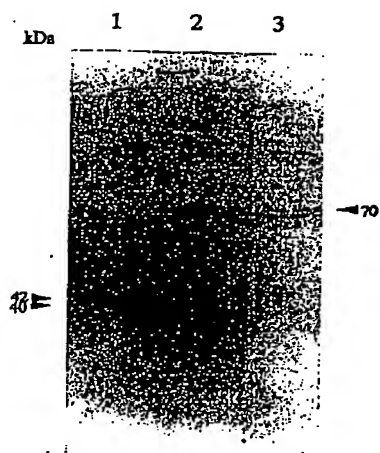
【図2】



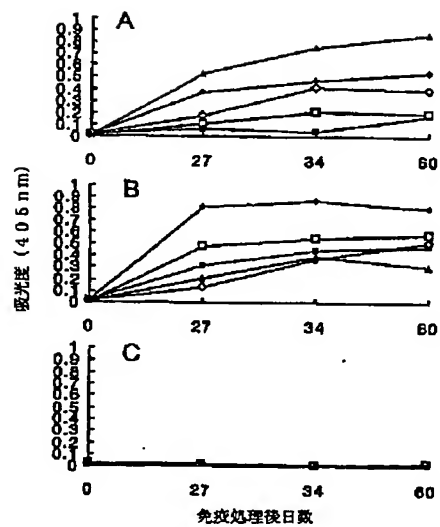
【図3】



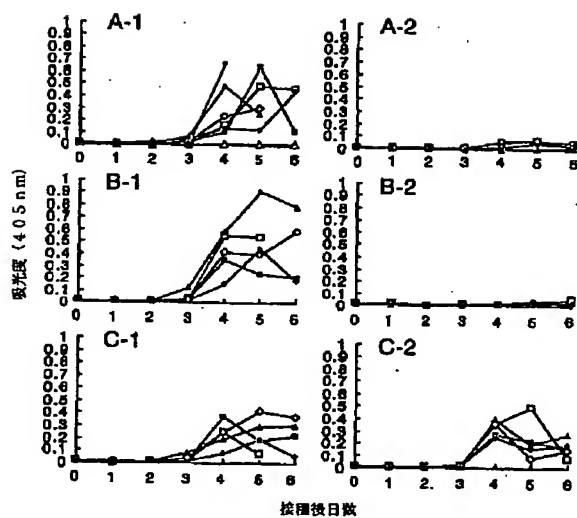
【図4】



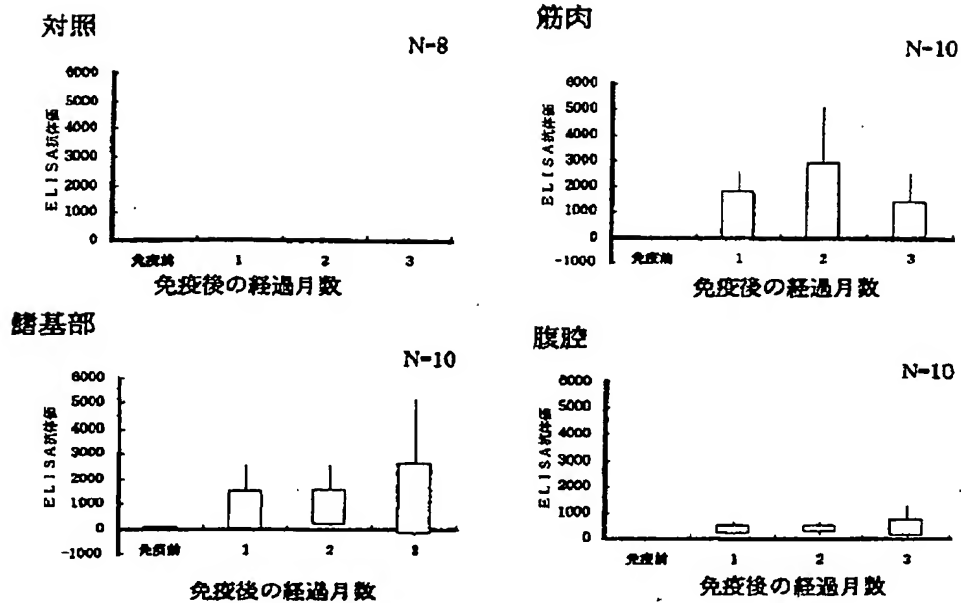
【図5】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
C 1 2 P 21/02		C 1 2 Q 1/70	
C 1 2 Q 1/70		G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53		33/569	L
33/569		C 1 2 N 15/00	A
//(C 1 2 N 1/21			
C 1 2 R 1:19)			
(C 1 2 N 15/09			
C 1 2 R 1:92)			
(C 1 2 P 21/02			
C 1 2 R 1:19)			

THIS PAGE BLANK (USPTO)